

**Der Einfluß einer 5-wöchigen Verabreichung von
Äthinylöstradiol, Norgestrel und der Kombination beider
Substanzen auf das Wachstum sowie den
Desoxyribonucleinsäure-, Ribonucleinsäure- und
Eiweißstoffwechsel von Leber und Nieren
weiblicher weißer Mäuse**

von

Theophanis Karavias

aus

Nicosia/Cypern

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. F. Heim

**Der Einfluß einer 5-wöchigen Verabreichung von
Äthinylöstradiol, Norgestrel und der Kombination beider
Substanzen auf das Wachstum sowie den
Desoxyribonucleinsäure-, Ribonucleinsäure- und
Eiweißstoffwechsel von Leber und Nieren
weiblicher weißer Mäuse**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Theophanis Karavias
aus
Nicosia/Cyperm

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der Universität
Erlangen-Nürnberg und mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes.



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Referent: Prof. Dr. F. Heim

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. P. Mitznegg

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 1973

E i n l e i t u n g

Die weiblichen Sexualhormone im engeren Sinne sind die Östrogene und das Progesteron. Es sind Steroide, die im Rahmen eines vom Hypothalamus beherrschten Regelkreises v.a. in Ovar und Nebenniere, im schwangeren Organismus von der fötoplazentaren Einheit gebildet werden. Ihre physiologische Aufgabe ist die Steuerung von Wachstum und Funktion der Sexualorgane. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß sie nicht nur das Wachstum ihrer spezifischen Zielorgane ("target-organ") wie Uterus, Vagina, Tuben und Mammæ, sondern auch daß sie andere Organe und Organsysteme zu beeinflussen vermögen, wobei sie sowohl anabole, d.h. eiweißaufbauende, als auch katabole, wachstumshemmende Wirkungen entfalten. (9,17, 18, 22, 32)

Da heute synthetisch hergestellte Östrogen-Gestagen Kombinationen in großem Umfang bereits vor Abschluß der Wachstumsphase als Kontrazeptiva verwendet werden, stellt sich die Frage, ob bei längerer Zufuhr solcher Hormonkombinationen Auswirkungen auf die körperliche Entwicklung zu erwarten sind und welche Komponente des Hormongemisches für den jeweiligen Effekt verantwortlich zu machen ist.(10)

In vorliegender Arbeit wurde an weiblichen weißen Mäusen der Einfluß einer 5-wöchigen Verabreichung (entsprechend etwa 10 Oestrus-Zyklen) eines als Kontrazeptivum verwendeten Östrogen-Gestagen-Gemisches, sowie dessen Einzelbestandteilen auf das Körpergewicht und das Gewicht von Leber und Nieren untersucht. Da Gewichtsänderungen von parenchymatösen Organen nicht notwendigerweise durch die Gewebssubstanz, sondern auch durch die vermehrte oder verminderte Einlagerung von Wasser verur-

sacht sein können, wurde außerdem der Proteingehalt der Organe bestimmt. Als weitere wichtige Zellinhaltsstoffe untersuchten wir den Gehalt an Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS), die als chemisches Substrat des genetischen Apparats und des proteinsynthetisierenden Systems der Zelle maßgeblich an der Steuerung der Wachstumsvorgänge beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurde auch die DNS-Syntheserate durch den Einbau von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin in die DNS von Leber und Nieren bestimmt.

Untersucht wurden das 17-Äthinyl-Östradiol und das d-13-Äthinyl-17a-äthinyl-17b-hydroxy-4-gonen-3-on (Norgestrel).

Die Substanzen wurden täglich einzeln bzw. in Kombination in der ovulationshemmenden Dosierung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol und 0,5 mg/kg Norgestrel subcutan verabreicht. Diese Applikationsform wurde gewählt, weil damit eine gleichmäßige und für Mäuse relativ niedrige Hormonzufuhr erreicht werden konnte, die etwa der 30-fachen Menge der beim Menschen üblichen Dosierung entspricht. Die bei Mäusen ovulationshemmende Dosis bei oraler Anwendung des Östrogen-Gestagen-Gemisches liegt demgegenüber etwa 2000 mal höher als bei der Frau (30, 31).

M e t h o d i k

Für die Versuche verwendeten wir 21 g schwere weibliche Mäuse des Inzuchtstammes NMRI/Han. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 24 - 26 °C gehalten und erhielten Wasser und eine Standardnahrung (Herilan^R) ad libitum.

Die Testsubstanzen* (0,05 mg/kg Äthinylöstradiol bzw. 0,5 mg/kg Norgestrel) wurden in jeweils 0,1 ml Ricinusöl gelöst und jeweils morgens s.c. appliziert. Der Kontrollgruppe wurde in entsprechender Menge das Lösungsmittel verabreicht.

Während der 5-wöchigen Versuchsdauer wurde täglich das Körpergewicht registriert. Am Ende der ersten und fünften Woche wurden die Gewichte der Leber und Nieren, sowie deren Gehalte an DNS, RNS und Eiweiß bestimmt. Außerdem wurde die Einbaurate von H-3 Thymidin in die DNS von Leber und Nieren gemessen. Dabei erhielten Versuchs- und Kontrolltiere jeweils 1 Stunde vor der Präparation eine Lösung von 0,5 mCi/kg H-3 Thymidin (spez. Aktivität 5 Ci/mmol Radiochemical Centre, Amersham) in 0,9% NaCl i.p. verabreicht.

* Die Substanzen wurden uns freundlicherweise von der Schering AG Berlin zur Verfügung gestellt.

B i o c h e m i s c h e B e s t i m m u n g e n

Nach Töten der Tiere durch Genickbruch wurden die Lebern und Niern entnommen und sofort in flüssigem Sauerstoff gefroren. Anschließend wurden die Organe gewogen und bis zur Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Zue Analyse wurden 0,2 bis 0,3 g Gewebe im 19-fachen Vol. eiskaltem Aq. dest. homogenisiert und alkalische Hydrolyse in "nlehnung an Hecht et al. (16) und Wool (43). 5 ml Homogenat (entsprechend 250 mg Frischgewicht) wurden mit der gleichen Menge eiskalter 0,6n Perchlorsäure (PCA) versetzt und unter Rühren 10 min. bei 4°C gehalten. (Die dabei entstandene 0,3n PCA eliminierte die säurelöslichen Gewebsbestandteile). Anschließend wurde zentrifugiert und der Niederschlag 2 mal mit eiskalter 0,2n PCA nachgewaschen. Der Rückstand wurde dann in 4 ml 10% NaCl aufgenommen und nach Neutralisierung mit NaOH (p^{H} 8) wurden die Proben 30 min. auf 100°C erhitzt, wobei die Nukleinsäuren als Na-Nukleate in Lösung gingen. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand mit dem 2-fachen Vol. eiskaltem 96% Äthanol vermischt und 18 Stunden bei 0°C aufbewahrt. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert, getrocknet und zur Gewinnung der RNS-Fraktion in 2 ml 0,3n NaOH 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Ansäuern mit 0,5 ml 2,7 mn PCA konnte die RNS im Überstand gewonnen werden. Der Rückstand wurde mit 0,2n PCA gewaschen und anschließend die DNS in 2 ml 0,5n PCA 15 min. bei 90°C extrahiert. Die Gesamtmengen an DNS und RNS wurden durch UV Absorption bei 265 bzw. 260 μu (1 cm Quarzküvetten gegen PCA) gemessen. Kontrollmessungen erfolgten durch die Orcin-Reaktion nach Mejbaum (27) für die RNS bzw. mittels der Di-

phenyl-Reaktion nach Dische (8) für die DNS. Als Eichsubstanzen dienten reinste hochpolymere DNS aus Kälberthymus, sowie RNS aus Hefe (Serva^R, Heidelberg). Die Radioaktivität der DNS wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung (BIOSPAN Modell 6803, NUCLEAR Chicago) von jeweils 1 ml DNS-Lösung in 10 ml eines industriell gefertigten Szintillator-Gemisches (Insta-Gel^R) gemessen.

Die Eiweißbestimmung erfolgte in 0,2 ml (3 10 mg Frischgewicht) des Gewebshomogenats mittels der Biuret-Methode (40) in der von Beisenherz und Mitarb. (2) modifizierten Weise. Nach Fällung des Eiweißes mit 1n PCA wurde 2 mal mit Äthanol-Äther (v/v 3:1) entfettet und der trockene Rückstand ad 5 ml Aqua dest. aufgeschwemmt. Nach Zugabe von 5 ml Biuret-Reagenz wurde 30 min. bei Raumtemperatur incubiert und anschließend die Absorption bei 546 mμ (2 cm Glasküvetten) gemessen. Als Eichlösung diente ein Standardserum (lab-trol^R).

Bei den biochemischen Analysen wurde zunächst die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in mg/g ermittelt und daraus der Gesamtgehalt des Organs berechnet. In den Abbildungen, mit Ausnahme von Abb. 1a, sind die prozentualen Änderungen bei den einzelnen Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollen angegeben.

S t a t i s t i k

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte jeweils zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und den Kontrollen mittels des t-Tests nach Student. Unterschiede wurden dann als signifikant angesehen, wenn $p \leq 0,05$ war. Die Mittelwerte

ergaben sich aus jeweils 8 - 14 Einzelbestimmungen. Die mittlere Streuung des Mittelwertes ist in den Abbildungen maßstabgerecht in % des zugehörigen Kontrollwertes eingetragen.

V e r s u c h s e r g e b n i s s e

1. Der Einfluß von Äthinylöstradiol, Norgestrel und der Kombination beider Substanzen auf das Körpergewicht.

Wie aus Abb. 1a und 6 hervorgeht, nimmt das Körpergewicht der Kontrolltiere während der 5-wöchigen Versuchsdauer kontinuierlich von 21 g auf 28 g zu.

Die tgl. s.c. Verabreichung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol verhindert eine Gewichtszunahme in den ersten beiden Wochen, so daß das Körpergewicht am Ende der ersten Woche um 3%, am Ende der zweiten Woche um 12% unter dem der Kontrollen liegt. In den folgenden 3 Wochen steigt das Körpergewicht der östrogen-behandelten Tiere an, so daß am Ende der 5. Woche kein Unterschied zu den Kontrollen besteht.

Die tägl. s.c. Verabreichung von 0,5 mg/kg Norgestrel führt besonders in den ersten 2 Wochen zu einem wesentlich stärkeren Gewichtsanstieg als bei den Kontrollen, das Körpergewicht ist nach 1 Woche um 10%, nach 2 Wochen um 14% und nach 5 Wochen um 11% höher als das der Normaltiere.

Die kombinierte Verabreichung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol und 0,5 mg/kg Norgestrel läßt in den ersten beiden Wochen keine Abweichung des Körpergewichts von dem der Kontrollen erkennen, nach 5 Wochen hingegen entspricht das Körpergewicht der Tiere dem der Norgestrel-behandelten Gruppe.

2. Der Einfluß von Äthinylöstradiol, Norgestrel und der kombinierten Verabreichung beider Substanzen auf die Organeichte von Leber und Nieren, sowie deren Gehalte an Protein und Nukleinsäuren.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, liegt das Gewicht der Leber 1 Woche

nach der tägl. Verabreichung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol 22% und nach 5 Wochen 45% über dem der Kontrollen.

Die Verabreichung von Norgestrel führt zu einer signifikanten Gewichtssveigerung um 5,5% nach der ersten und um 16% nach der 5. Woche.

Die Kombination beider Substanzen führt zu einer Steigerung um 16% nach einwöchiger Behandlung und um 68% nach 5 Wochen.

Beim Gewicht der Niere ergibt sich 1 Woche nach Behandlungsbeginn mit Äthinylöstradiol eine leichte Abnahme um 7%, am Ende der 5. Woche liegt jedoch das Nierengewicht 10,7% über dem der Kontrollen.

Die Verabreichung von Norgestrel allein läßt das Nierengewicht nach einer Woche um 17,5 und nach 5 Wochen um 22,8% ansteigen, während die kombinierte Behandlung mit Äthinylöstradiol und Norgestrel in der ersten Woche zu keiner Veränderung, am Ende der 5. Woche zu einem Gewichtsanstieg um 17% geführt hat.

Der Proteingehalt der Leber steigt nach Äthinylöstradiol um 9,7% nach der ersten und um 49% nach der 5. Woche an. Die Verabreichung von Norgestrel führt nur am Ende der 5. Woche zu einer signifikanten Zunahme von 29,5%, die Proteingehalte der kombiniert behandelten Gruppe liegen geringfügig über denen der Östrogentiere.

Der Proteingehalt der Niere wird in der ersten Woche nur durch Norgestrel gesteigert, er liegt 5 Wochen nach Äthinylöstradiol-Behandlung um 11%, nach Norgestrel um 38% und nach der Kombination um 32% über dem der Kontrollen.

Die Verabreichung von Äthinylöstradiol steigert den RNS-Gehalt der Leber nach einer Woche um 27%, nach 5 Wochen um 59%. In der Niere führt diese Behandlung in der ersten Woche zu keiner Änderung des RNS-Gehaltes, nach 5 Wochen zu einer Zu-

nahme um 25%. Im Gegensatz dazu wird durch die Verabreichung von Norgestrel der RNS-Gehalt der Leber in der ersten Woche nicht beeinflusst und ist erst nach 5 Wochen um 33% erhöht, während der RNS-Gehalt der Niere bereits nach einer Woche um 29,5%, nach 5 Wochen um 65% hochsignifikant gesteigert wird. Die kombinierte Verabreichung beider Hormone erhöht den RNS-Gehalt der Leber nach der 5. Woche um 82%, der Gehalt der Nieren liegt 12 bzw. 42% über dem der Kontrollen.

In ganz ähnlicher Weise wird auch der DNS-Gehalt von Leber und Nieren beeinflusst. In der Leber beträgt die Steigerung des DNS-Gehalts durch die tägliche Verabreichung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol nach 1 Woche 31%, nach 5 Wochen 82%. In der Niere findet man in der ersten Woche keine Änderung des DNS-Gehalts, nach 5 Wochen eine Zunahme um 23%.

Demgegenüber wird durch Norgestrel der DNS-Gehalt der Leber erst nach 5 Wochen um 26% erhöht, während der DNS-Gehalt der Nieren um 26% nach der ersten und um 44% nach der 5. Woche zugenommen hat.

Die kombinierte Verabreichung von Äthinylöstradiol und Norgestrel führt bei Leber und Nieren zu Veränderungen des DNS-Gehalts, die im Rahmen der Streuung den Effekten der Östrogenbehandlung entsprechen.

3.- Der Einfluß von Äthinylöstradiol bzw. Norgestrel auf den Einbau von 3-H-Thyminidin in die Leber- bzw. Nieren-DNS.

In den Abbildungen ist weiterhin der Einfluß von Äthinylöstradiol auf die Einbaurrate von 3-H-Thyminidin in die DNS der Leber (Abb 2A), sowie von Norgestrel auf die Einbaurrate von 3-H-Thyminidin in die DNS der Nieren (Abb. 3B) dargestellt. Sie ist

als totale Aktivitätsaufnahme als cpm/ Gesamt-DNS angegeben. Die Aktivitätsaufnahme in die DNS der Leber wird durch Äthionylöstradiol bereits nach einer Woche hochsignifikant um 197% gesteigert. Am Ende der 5. Woche liegt sie 79,8% über den entsprechenden Kontrollwerten. In den Nieren sind die Einbau-raten unter dem Einfluß von Norgestrel um 83% am Ende der ersten Woche und um 132% nach der 5. Woche erhöht.

Besprechung der Versuchsergebnisse

1. Der Einfluß des Östrogens, Gestagens und Östrogen-Gestagen-Gemisches auf das Körpergewicht.

Unsere Versuchstiere hatten beim Start ein Gewicht von 21 g und ein durchschnittliches Lebensalter von 32 Tagen, was etwa dem Ende der Pubertätsphase entspricht. Die unbehandelten Kontrollen zeigten während der 5 wöchigen Versuchsdauer eine Gewichtszunahme um 7 g. Die tägliche Verabreichung eines Östrogen-Gestagen-Gemisches in der Dosierung von 0,05mg/kg Äthinylöstradiol und 0,5 mg/kg Norgestrel führte in den ersten beiden Wochen zu keiner Abweichung des Körpergewichts von den Kontrollen. Es ist am Ende der 5. Woche um 10% erhöht. Diese Effekte resultieren, wie sich aus Abb. 1 ergibt, aus der unterschiedlichen Wirkung der Einzelkomponenten des Hormongemisches. Während Äthinylöstradiol in den ersten beiden Wochen das normale Körperwachstum unterdrückt, führt die Verabreichung von Norgestrel zu einer um 14% über das Normalgewicht hinausgehenden Gewichtszunahme. Zwischen der 2. und 5. Woche kommt es nun bei den Östrogenbehandelten Tieren zu einem wesentlich stärkeren Wachstum als bei den Kontrollen, so daß am Ende der 5. Woche der anfängliche Wachstumsrückstand ausgeglichen ist. Die Wachstumsgeschwindigkeit der gestagenbehandelten Tiere entspricht in diesem Zeitraum der der Kontrollen. Aus dem fehlenden Einfluß des Östrogen-Gestagen-Gemisches auf die Körperwachstumsgeschwindigkeit ergibt sich, daß bei den kombiniert behandelten Mäusen die gestagenbedingte Wachstumssteigerung durch die wachstumshemmende Wirkung der Östrogene aufgehoben wird.

Die Ursache der in der Literatur bereits mehrfach beschriebenen vorübergehenden oder auch anhaltenden Hemmung des Körperwachstums durch Östrogene ist noch ungeklärt (3). Diskutiert wird vor allem eine freiwillige Einschränkung ("voluntary restriction") der Nahrungsaufnahme (30). Für diese Annahme sprechen auch Ergebnisse aus "pair-fed" Versuchen, die gezeigt haben, daß bei Ratten eine durch Östrogenbehandlung verminderte Nahrungsaufnahme zu gleichen Wachstumshemmungen führt, wenn unbehandelten Tieren nur die von den Östrogenbehandelten aufgenommene Futtermenge zugebilligt wurde (37). Wade und Zucker (39) vermuten in diesem Zusammenhang, daß Östrogene direkt die ventromedialen Zentren im Hypothalamus ("Hungerzentrum"), die die Nahrungsaufnahme steuern, zu beeinflussen vermögen. Daneben wird auch eine direkte hemmende Wirkung der Östrogene auf das Wachstum gewichtsbestimmender Organe diskutiert (13) oder, wie aus den Untersuchungen von Wiedemann und Schwartz (41) hervorgeht ein peripherer Antagonismus zwischen Östrogen und Wachstumshormon am "sulfation factor" der das Längenwachstum der Knochen induziert, angenommen. Die Annahme, daß die Östrogene durch eine "funktionelle Hypophysektomie" im Sinne einer Sekretionshemmung des somatotropen Hormons wirken, konnte dagegen nicht bestätigt werden (19). Auch ein durch Östrogen erhöhter Grundumsatz als Ursach der Gewichtsabnahme konnte ausgeschlossen werden (30).

Bei Ratten und Mäusen ist eine Körpergewichtszunahme nach Gestagen nur bei weiblichen Tieren beobachtet worden (9). Trentin (38)

zog aus dieser Tatsache die Schlußfolgerung, daß die Gestagene selbst keinen Einfluß auf das Körpergewicht ausüben, sondern durch ihre Östrogen-antagonistische Wirkung den Organismus vor einer wachstumshemmenden Wirkung der östrogenen Hormone schützen. In diesem Sinne sprechen auch unsere Beobachtungen, daß die wachstumshemmende Wirkung des exogen zugeführten Äthinylöstradiols durch Norgestrel aufgehoben wird. Andererseits kann dessen gewichtssteigernder Effekt auf eine Hemmung der körpereigenen Östrogene zurückgeführt werden (9, 12).

2. Der Einfluß des Östrogens, Gestagens und deren Gemisch auf das Gewicht der Leber und Niere und auf deren Gehalt an Protein, DNS und RNS.

Betrachtet man die Effekte von Äthinylöstradiol, Norgestrel und der Kombination beider Substanzen auf das Gewicht von Leber und Nieren, so läßt sich feststellen, daß die Hormone in beiden Organen zu Wachstumssteigerungen führen. Die Leber hat sich dabei als besonders empfindlich gegenüber Östrogen gezeigt, was in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen anderer Autoren steht, die gezeigt haben, daß sowohl die exogene Verabreichung von Östrogenen als vor allem auch eine Zunahme körpereigener Östrogene während der Schwangerschaft das Leberwachstum stimuliert (4, 5, 6, 11, 18, 25, 29, 30, 33, 34, 36, 42). Die Wirkung des Norgestrels auf das Leberwachstum ist quantitativ geringer, die kombinierte Verabreichung von Äthinylöstradiol und Norgestrel führt zu einem additiven Effekt. Demgegenüber findet man an der Niere eine Wachstumsstimulierung vorwiegend durch Norgestrel. Nach Östradiol zeigt sich in der ersten Woche, zu einem Zeitpunkt, zu dem das Körper-

gewicht der Tiere unter dem der Kontrollen liegt, ebenfalls eine leichte Hemmung des Nierenwachstums, erst am Ende der 5. Woche ist das Nierengewicht signifikant erhöht. Eine kombinierte Behandlung mit Norgestrel und Äthinylöstradiol vermag den Gestageneffekt nicht zu steigern. Die Ursachen für dieses Verhalten sind darin zu sehen, daß sich die Nieren weißer Mäuse, die auf Grund von phylo- und ontogenetischer Beziehung den Sexualorganen sehr nahe stehen, als direktes Targetorgan für androgene Hormone erwiesen haben (8, 22, 23). Die relativ starke anabole Wirkungskomponente der Gestagene, die sich offenbar aus ihren großen strukturellen Ähnlichkeiten zum Testosteron und anderen anabol wirksamen Androgenderivaten ergibt (9, 24, 26), scheint auch beim Norgestrel zu einer maximalen Stimulierung des Nierenwachstums zu führen, die durch die zusätzliche Verabreichung des Äthinylöstradiols sogar leicht gehemmt wird. Dieser Effekt ließe sich folgendermaßen erklären: Sowohl das Äthinylöstradiol als auch das Norgestrel besitzen in der Niere einen gemeinsamen Rezeptor, wobei jedoch die Wirkung des Norgestrels, wie oben angeführt wurde, stärker ist als die des Äthinylöstradiols. Bei kombinierter Verabreichung beider Substanzen werden diese auf die vorhandenen Rezeptoren gleichmäßig verteilt. Daraus ergibt sich, daß in diesem Falle für das Norgestrel weniger Rezeptoren zur Verfügung stehen, weshalb sein Effekt in der Kombination mit Äthinylöstradiol geringer ist als bei alleiniger Verabreichung, bei der sämtliche Rezeptoren in der Niere vom Norgestrel besetzt werden.

Demgegenüber scheinen in der Leber durch die Verabreichung der Einzelsubstanzen nicht alle Rezeptoren abgesättigt zu sein

so daß es bei der kombinierten Behandlung mit Äthinyl-
östradiol und Norgestrel zu einem additiven Effekt kommt

Daß es sich bei den Gewichtszunahmen von Leber und Nieren um ein echtes Wachstum und nicht etwa um eine vermehrte Einlagerung von Wasser handelt, zeigt die dem Organgewicht im wesentlichen parallel verlaufende signifikante Zunahme des Proteingehaltes.

Nach heutiger Kenntnis muß der Neosynthese von Proteinen eine Aktivierung des genetischen Apparats und eine Neubildung von RNS vorausgehen; denn nur nach dem Code der an der DNS des Zellkerns transkribierten messenger-RNS können unter Mitwirkung von transfer-RNS die einzelnen Aminosäuren an den Ribosomen des Cytoplasmas zu Eiweißkörpern verknüpft werden ("Translation") (20). Demzufolge wird auch der primäre Angriffspunkt wachstumsfördernder Hormone an der DNS Matrize vermutet, wo sie durch direkte Einwirkung oder auch indirekte über die Vermittlung eines sogenannten zweiten Boten "second messenger") bestimmte Repressoren beseitigen und damit den Ablauf der Transcriptions- und Translationsprozesse induzieren sollen (1,14,15,35,21,34,42). So ist von mehreren Autoren eine Erhöhung der Inkorporation von Aminosäuren (4, 25, 42), sowie der Enzyme des Aminosäurestoffwechsels (30) in der Leberzelle nach Verabreichung von Östrogen beschrieben worden. Es ist also zu erwarten, daß in einer anabolen Phase mit verstärkter Protein- und Gewebsneubildung zunächst ein Anstieg der Ribonukleinsäuren erfolgt. In der Tat führt, wie unsere Befunde zeigen, sowohl die Verabreichung von Äthinylöstradiol

als auch von Norgestrel sowie der Kombination beider Substanzen zu einer über die Steigerung des Proteingehalts hinausgehenden Zunahme des RNS-Gehalts in Leber und Nieren.

In qualitativer Hinsicht zeigt sich wiederum, daß die anabole Wirkung des Östrogenderivates vorwiegend den RNS Gehalt der Leber erhöht und die kombinierte Verabreichung von Äthinylöstradiol und Norgestrel zu einem additiven Effekt an diesem Organ führt. Der RNS Gehalt der Niere dagegen wird vom Norgestrel allein am stärksten gesteigert, was auf eine spezifisch nierenanabole Wirkung des Gestagens und einen zumindest in der Kombination eher hemmenden Effekt des Äthinylöstradiols schließen läßt.

3. Der Einfluß von Äthinylöstradiol bzw. Norgestrel auf die ³H-Thymin Einbaurrate in die DNS von Leber bzw. Niere.

Die Tatsache, daß es unter dem Einfluß von Äthinylöstradiol bzw. Norgestrel auch zu einem über die Gewichtszunahme hinausgehenden Anstieg des DNS Gehalts gekommen ist zeigt, daß diese Hormone auch eine beschleunigte DNS Synthese mit vermehrter Zellneubildung oder, wie für die Wirkung anderer Anabolica an Leber und Nieren gezeigt werden konnte Polyploidisierung von Zellkernen induziert haben (17, 28, 30, 34). Diese Annahme wird bestätigt durch Einbauversuche von radioaktiv markiertem Thymin in die DNS, die wir unter dem Einfluß von Äthinylöstradiol an der Leber, bzw. unter dem Einfluß des

renotropen Norgestrels an der Niere durchgeführt haben. Die von der gesamten DNS der Leber aufgenommene Aktivität liegt bereits eine Woche nach Äthinylöstradiol hochsignifikant um ca. 200% über dem entsprechenden Kontrollwert. Nach 5 Wochen entspricht die Einbaurate der von Normaltieren; die gesamte Aktivitätsaufnahme durch die Leber-DNS ist in Übereinstimmung mit dem vermehrten DNS-Gehalt um 80% erhöht. Dieser Befund deutet darauf hin, daß der DNS-Gehalt infolge Zellvermehrung oder Polyploidisierung in der Leber bereits einen Grenzwert angenommen hat, so daß der Organismus einer weiteren Steigerung der DNS-Bildung entgegenwirken muß. An der Niere, wo die DNS Bildung unter dem Einfluß von Norgestrel auch nach 5 Wochen noch nicht das Ausmaß der Östrogen-induzierten Werte in der Leber erreicht hat, ist eine derartige Reduzierung der ^3H -Thymidineinbaurate nicht erfolgt, die Aktivitätsaufnahme der DNS liegt mit 83% nach der ersten bzw. 132% nach der 5. Woche hochsignifikant über den der Kontrollen.

Unsere Versuche haben ergeben, daß es durch längere Einwirkung von Hormongemischen, die als orale Kontrazeptiva Verwendung finden zu Wachstumsverschiebungen sowohl des Gesamtorganismus als auch einzelner lebenswichtiger parenchymatöser Organe wie Leber und Nieren kommen kann. Die Einzelkomponenten der Hormonkombination führen zu quantitativ unterschiedlichen Effekten, die von der spezifischen Ansprechbarkeit des jeweiligen Organs abhängig sind. Da, wie sich gezeigt hat, der Angriffspunkt dieser Arzneimittel an der wachstumssteuernden

Funktion des genetischen Apparates der Zelle anzunehmen ist, sollte auch unter diesem Gesichtspunkt ihre Verabreichung an noch wachsende Individuen nicht unkritisch erfolgen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Unter der täglichen parenteralen Verabreichung eines

Östrogen-Gestagen Gemisches in der für weiße Mäuse ovulationshemmenden Dosisierung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol und 0,5 mg/kg Norgestrel kommt es in den ersten beiden Wochen zu keiner Änderung des Körperwachstums gegenüber unbehandelten Kontrollen. Am Ende der 5. Woche ist das Körpergewicht um 10% erhöht. Diese Effekte resultieren aus der unterschiedlichen Wirkungsweise der Einzelkomponenten der Hormonkombination. Während Äthinylöstradiol das normale Körperwachstum in den ersten 14 Tagen unterdrückt, führt Norgestrel zu einer Wachstumssteigerung um 18%. Zwischen der 2. und 5. Woche gleichen die östrogen-behandelten Tiere den Wachstumsrückstand wieder aus. Da der gewichtssteigernde Effekt des Norgestrels weiterhin wirksam bleibt, liegt am Ende des Versuchszeitraums sowohl das Gewicht der gestagenbehandelten als auch der kombiniert mit Äthinylöstradiol und Norgestrel behandelten Tiere signifikant über dem der Kontrollen.

2. An Leber und Nieren findet man sowohl nach Äthinylöstradiol als auch nach Norgestrel und der kombinierten Verabreichung beider Hormone eine Zunahme des Organgewichts sowie des Gehalts an DNS, RNS und Eiweiß. In qualitativer Hinsicht zeigt sich ein unterschiedliches Verhalten der Organe gegenüber Äthinylöstradiol bzw. Norgestrel. Während das Östrogen vorwiegend das Leberwachstum stimuliert, erweist sich die Niere, die bei weißen Mäusen auf Grund phylogenetischer und ontogenetischer Beziehungen den Sexualorganen sehr nahe steht und als androgen-

sensibles "target"-Organ gilt, besonders empfindlich gegenüber dem strukturell testosteronähnlichen Norgestrel. Die kombinierte Verabreichung beider Hormone führt an der Leber zu einem additiven Effekt; demgegenüber wird die Stimulierung des Nierenwachstums durch Norgestrel durch die zusätzliche Verabreichung von Äthinylöstradiol leicht gehemmt.

3. Nach heutiger Kenntnis ist der primäre Angriffspunkt wachstumsfördernder Hormone an der DNS des Zellkerns anzunehmen, wo sie bestimmte Repressoren beseitigen und damit den Ablauf der Transkriptions- und Translationsprozesse induzieren sollen. Einbauversuche mit radioaktiv markiertem Thymidin in die DNS der Leber- bzw. der Nieren haben ergeben, daß auch Äthinylöstradiol bzw. Norgestrel die DNS-Syntheserate steigern, so daß die Zunahme des DNS-Gehalts und die daraus resultierende RNS- und Proteinvermehrung als anabole Effekte gedeutet werden müssen und nicht auf einer Hemmung biologischer Abbauprozesse beruhen.

Es hat sich gezeigt, daß es durch längere Einwirkung von Hormongemischen, die als orale Kontrazeptiva Verwendung finden sowie durch deren Einzelkomponenten zu Wachstumsverschiebungen sowohl des Gesamtorganismus als auch einzelner lebenswichtiger parenchymatöser Organe wie Leber und Nieren kommen kann. Da der Angriffspunkt dieser Arzneimittel an der wachstumssteuernden Funktion des genetischen Apparates der Zelle anzunehmen ist, sollte auch unter diesem Gesichtspunkt ihre Verabreichung an noch wachsende Individuen nicht unkritisch erfolgen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Barton, R.W., Shutsung Liao

A similarity in the effect of estrogen and androgen on the synthesis of ribonucleic acid in the cell nuclei of gonado hormone-sensitive tissues.

Endocrinology 81, 409-412 (1967)

2. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.

Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäurehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)

3. Ber, A.

Body and organ weights in rats ovariectomized before puberty
Endokrinologie (1972) Bd. 59, Heft 2 S.187-196

4. Burt, R.L. and Warren, N., Dannenburg

The effect of pregnancy on Glycine-1-C¹⁴ incorporation in liver protein of the rat

Acta Endocrin. 50 (1965) 643

5. Campbell, R.M., Innes, I.R. and Kosterlitz, H.W.

Role of hormonal and dietary factors in formation of excess ribonucleic acid in livers of pregnant rats

J. Endocr. 9, 52-67 (1953)

6.) Campbell, R.M. and Kosterlitz, H.W.

Species differences in the deoxy-ribonucleic and ribonucleic

acid contents of livers of pregnant mice, guinea-pigs and cats.

J. endocr. 9, 45-51 (1953)

7. Dewar, A.D.

The nature of the weight gain induced by progesterone in mice.

Acta Endocr. (Kbh) Suppl. 67 (1962) 112

8. Dische, Z.

Über eine neue charakteristische Farbreaktion der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen
Mikrochemie 8, 4 - 32 (1930)

9. Edgren, R., Peterson, D.L., Jones, R.C., Nagra, C.L., Smith, H., Hughes G.

Biological effects of synthetic gonanes

Recent Progr. Horm. Res. 22, 305-349 (1966)

10. Fahim, D.G., Hall and Jones, T.

Effect of ovarian steroids on hepatic metabolism. II Estrogens
Amer. J. Obstet. Gynec. (1971) Vol. 109 Nr.4: 558-563

11. Fisher, C.J. and Leathem, J.H.

Effect of a protein-free diet on protein metabolism in the pregnant rat.

Endocrinology 3, 454-462 (1965)

12. France, E.S., Pincus, G.

Biologically active substances effecting gonadotropin induced ovulation in immature rats

Endocrinology 75, 359 (1964)

13. Glasser, S.R.

Influence of an adequate dietary protein on the immediate and latent effects of stilbestrol.

Amer. J. Physiol. 179, 421 (1954)

14. Görlich, M.

Aufbau und Wirkungsweise der Steroidhormonrezeptoren hormonabhängiger Organe

Arch. Geschwulstforschung 37/2, 161 (1971)

15. Gruga, S. and Holak, H.

Comparison of the behaviour of nucleic acids in the liver cells of mice treated with large doses of various steroid compounds.

Folia histochemica et cytochemica (Krakow) 7, 325-338 (1969)

16. Hecht, L.I. and Potter, B.

Nucleic metabolism in regenerating rat liver. III. I. mediates in the synthesis of DNA pyrimidine nucleotides.

Cancer Res. 16, 999-1004 (1956).

17. Heim, F., W. Schwarzlose, H. Truckenbrot und P. Mitznegg.

Desoxyribonukleinsäure-, Ribonukleinsäure und Eiweißgehalt Zellneubildung und Zellgröße in Abhängigkeit von Alter Geschlecht und Ernährung und deren Beeinflussung durch anabole und antianabole Stoffe.

Z. Gerontol. Bd. 2, Heft 1, 25-47 (1969)

18. Heim, F. und Schwarzlose, W.

DNS- RNS- und Eiweißneubildung sowie Zellhypertrophie und Zellvermehrung nach 17-Hydroxy-4-Chlor-androstenon-17-acetat (Sternabol^R)

Z. Gerontol. 1, 10 - 14 (1968)

19. Herbai, G.

Studies on the site and mechanism of action of the growth inhibiting effects of estrogens.

Acta physiol. scand. 83, 77 - 90 (1971)

20. Jacob, F., Monod, J.

Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins
J. molec. Biol. 3, 318 (1961)

21. Kidson, C. and Kirby, K.S.

Selective alterations of mammalian mRNA synthesis: Evidence for differential action of hormones on Gene transcription.
Nature 203, 599 - 603 (1964)

22. Kochakian, C.D.

Protein anabolic effects of steroid hormones
Vitam. and Horm. 4, 255 - 310 (1946)

23. Kochakian, C.D.

Renotropic-androgenic properties of orally administered androgens.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 80, 386 - 388 (1952)

24. Kramer, M., Dambrosch und Klink, G.

Sonstige Wirkungen von Gestagenen
In: Handbuch der Experimentellen Pharmakologie Bd. XXII
S. 555, Springer Berlin-Heidelberg-N.York 1969

25. Little, B. and Lincoln, E.

Effect of estrogen, progesterone and testosterone on the incorporation of L-valine-1-C¹⁴ into protein of rat-liver and uterus
Endocrinology, Vol 74 Nr. 1, 1 - 8 (1964)

26. McGinty, D.A., Djerassi, C.

Some chemical and biological properties of 19-nor-17a-ethinyl testosterone.

Ann (N.Y.) Acad. Sci. 71, 500 - 515 (1958)

27. Mesbaum, W.

Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure

Hoppe - Seylers Z. physiol Chemie 258, 117-120 (1939)

28. Mitznegg, P.

Der Einfluß des Eiweiß- bzw. Aminosäuregehaltes der Nahrung auf Gewicht, Zellzahl sowie Desoxyribonukleinsäure-, Ribonukleinsäure-, und Eiweißgehalt der Niere wachsender weißer Mäuse

Dissertation

29. Heim, F. und Mitznegg, P.

Anabolismus und Schwangerschaft

Archiv f. Gynäk. 206, 437 - 449 (1968)

30. Mitznegg, P., Schwarzlose, W. Estler, C.-J., Hach, B., Heim, F.

Der Einfluß einer perioral verabreichten Östrogen-Gestagen-Kombination auf das Wachstum und den Stoffwechsel von Leber und Niere junger weiblicher Ratten.

Klin. Wschr. 49, 615 - 617 (1971)

31. Neumann, F.

Wirkungen von Gestagenen auf das Ovar und Beeinflussung der Ovarialfunktion. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Bd. XXII/2 S. 87. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York.

32. Overbeek, G. A.
Anabole Steroide, Chemie und Pharmakologie
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1966 S.5
33. Poo, K. L., Lew, W. and T. Addis
Protein anabolism of organs and tissues during pregnancy
and lactation.
J. Biol. Chem. 128, 69-77 (1939)
34. Schwarzlose, W. und Heim, F.
The anabolic effects of estrogens on the mouse liver and
their inhibition by clomiphene.
Biochem. Pharm. 19, 23 (1970)
35. Sekeris, C. E.
Wirkung der Hormone auf den Zellkern. In: Wirkungsmechanismen
der Hormone (Ed. P. Karlson)
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York . S. 126 (1967)
36. Song, C.S., A.B. Rifkind, P.N. Gillette and A. Kappas
The effect of estrogens, progestins, and pregnancy on hepatic
function.
Amer. J. Obst. Gynec. 105 813 (1969)
37. Sullivan, W. and Smith, T.C.
Influence of estrogens on body growth and food intake.
Proc. nat. exp. Biol. Med. 96, 60 (1957)
38. Trentin, J.J.
Sex difference in the effect of progesterone on body weight
of mice
Proc. soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 75, 267 - 269 (1950)

39. Wade, G.N. and Zucker, I.

Development of hormonal control over food intake and body weight in female rats.

J. comp. Phys. Psych. Vol. 70 Nr.2, 213 - 220 (1970)

40. Weichselbaum, T.E.

Accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma.

Am. J. Clin. Path. 10, 40 (1946)

41. Wiedemann, E., Schwartz, E.

Suppression of growth hormone-dependent human serum sulfation factor by estrogen.

J. Clin. Endocr. 34, 51 - 58 (1972)

42. Wilson, J.D.

Influence of estradiol administration on protein synthesis in homogenates of hen oviduct

Bioch. Biophys. Research communications Vol. 8 Nr.3 S.175-179 (1962)

43. Wool, I.G.

Effect of insulin on acid synthesis in isolated rat diaphragma

Bioch. Bioph. Acta 66, 28-33 (1963)

Legend

Abb. 1 A:

Verlauf des Körpergewichtes während der 5-wöchigen Versuchsdauer bei: 1. unbehandelten weißen weiblichen Mäusen (ausgezogene Linie)

2. täglicher parenteraler Verabreichung von 0,05mg/kg Äthinylöstradiol (gestrichelte Linie)

3. täglicher parenteraler Verabreichung von 0,5mg/kg Norgestrel (punktirierte Linie)

4. kombinierter parenteraler Verabreichung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol und 0,5mg/kg Norgestrel (strichpunktirierte Linie)

Abb. 1 B:

Prozentuale Änderungen des Körpergewichtes gegenüber unbehandelten Kontrollen 1, 2 und 5 Wochen nach tgl. parenteraler Verabreichung von a. 0,05mg/kg Äthinylöstradiol

b. 0.5mg/kg Norgestrel

c. 0,05mg/kg Äthinylöstradiol und 0,5mg/kg Norgestrel

Abb. 2 A:

Prozentuale Änderungen gegenüber unbehandelten Kontrollen des Organgewichtes sowie des Gehalts der Leber an Protein, RNS, DNS und des ^3H -Thymidineinbaus in die gesamte Leber-DNS 1 und 5 Wochen nach tgl. parenteraler Verabreichung von 0,05mg/kg Äthinylöstradiol.

Abb.2B:

Prozentuale Änderungen gegenüber unbehandelten Kontrollen des Organgewichts sowie des Gehalts der Leber an Protein, RNS und DNS 1 und 5 Wochen nach täglicher parenteraler Verabreichung von 0,5 mg/kg Norgestrel.

Abb.2C:

Prozentuale Änderungen gegenüber unbehandelten Kontrollen des Organgewichts und Gehalts der Leber an Protein, RNS und DNS 1 und 5 Wochen nach täglicher parenteraler Verabreichung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol und 0,5 mg/kg Norgestrel.

(Mittelwerte $\pm$ S.E.M. der Kontrolltiere

1. Woche:	Organgewicht:	1189mg $\pm$ 32,3mg
	Protein:	205mg $\pm$ 4,9mg
	RNS:	12,9mg $\pm$ 0,4mg
	DNS:	3.34mg $\pm$ 0,08mg
	³ H-Thymidineinbau:	12,7cpm/DNS $\pm$ 1,75cpm/DNS
5. Woche:	Organgewicht:	1429mg $\pm$ 47,2mg
	Protein:	261mg $\pm$ 42,9mg
	RNS:	15,4mg $\pm$ 0,66mg
	DNS:	3,6mg $\pm$ 0,18mg
	³ H-Thymidineinbau:	11,7cpm/DNS $\pm$ 1,3cpm/DNS

Abb.3A:

Prozentuale Änderung gegenüber unbehandelten Kontrollen des Organgewichts und Gehalts der Niere an Protein, RNS und DNS 1 und 5 Wochen täglicher parenteraler Behandlung mit 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol.

Abb. 3B

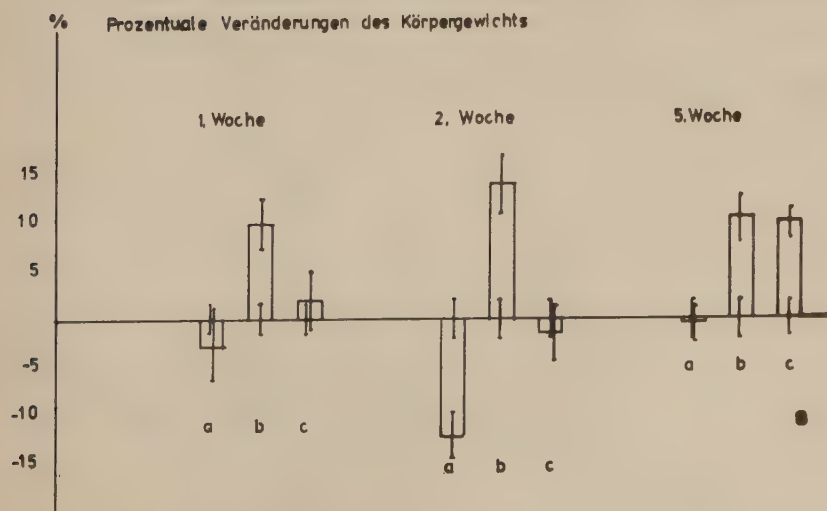
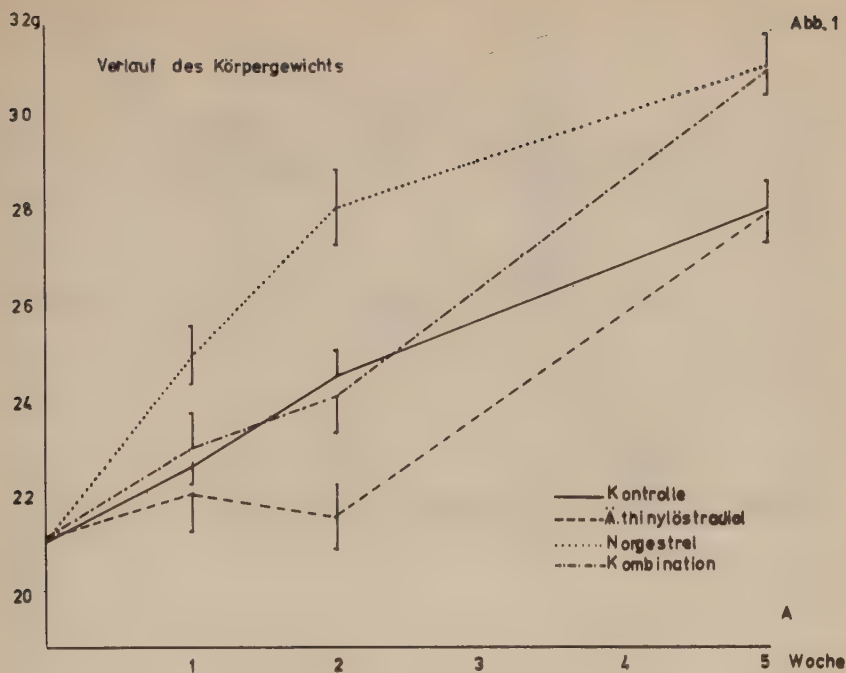
Prozentuale Änderungen gegenüber unbehandelten Kontrollen des Organgewichts und Gehalts der Niere an Protein, RNS, DNS und ^3H -Thymidineinbaus in die gesamte Nieren-DNS 1 und 5 Wochen nach täglicher parenteraler Verabreichung von 0,5 mg/kg Norgestrel.

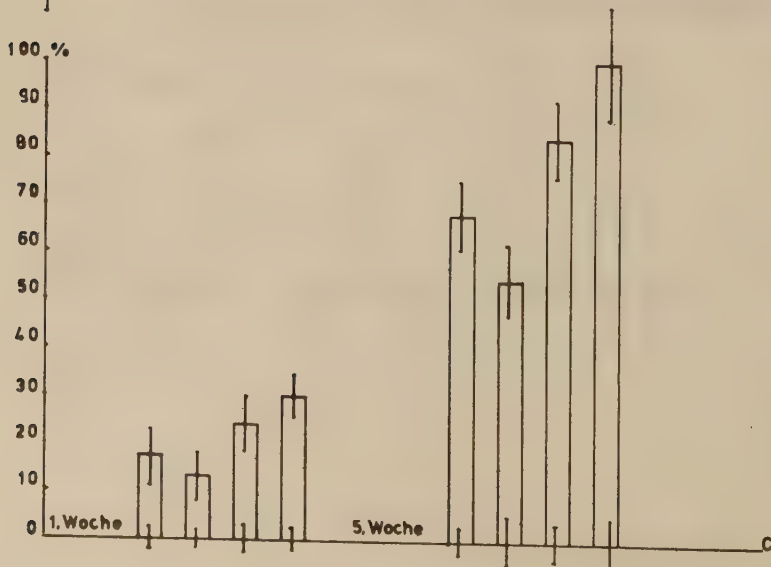
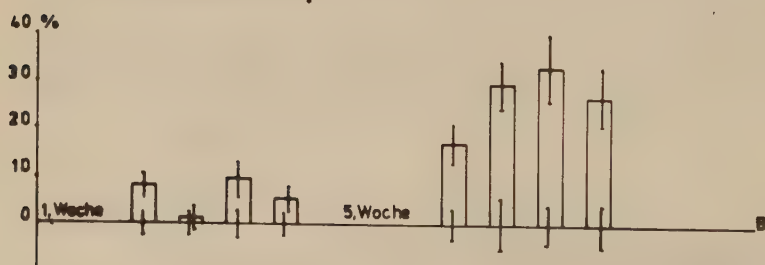
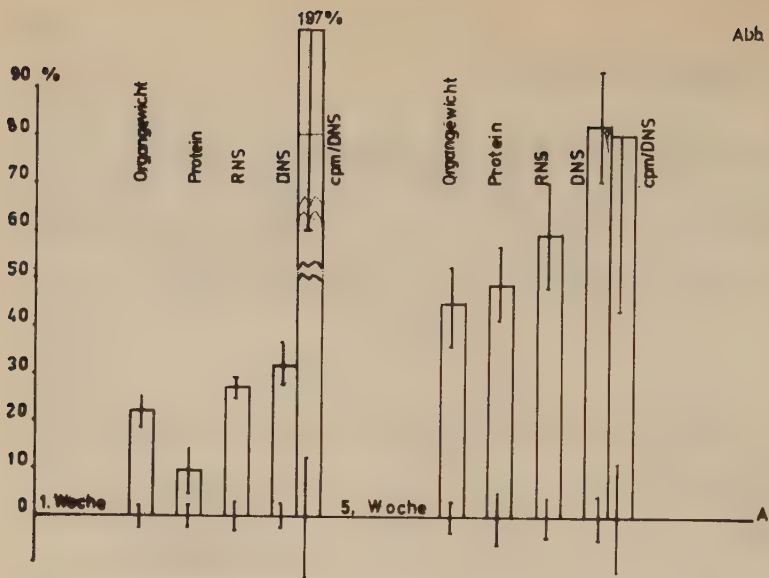
Abb. 3C:

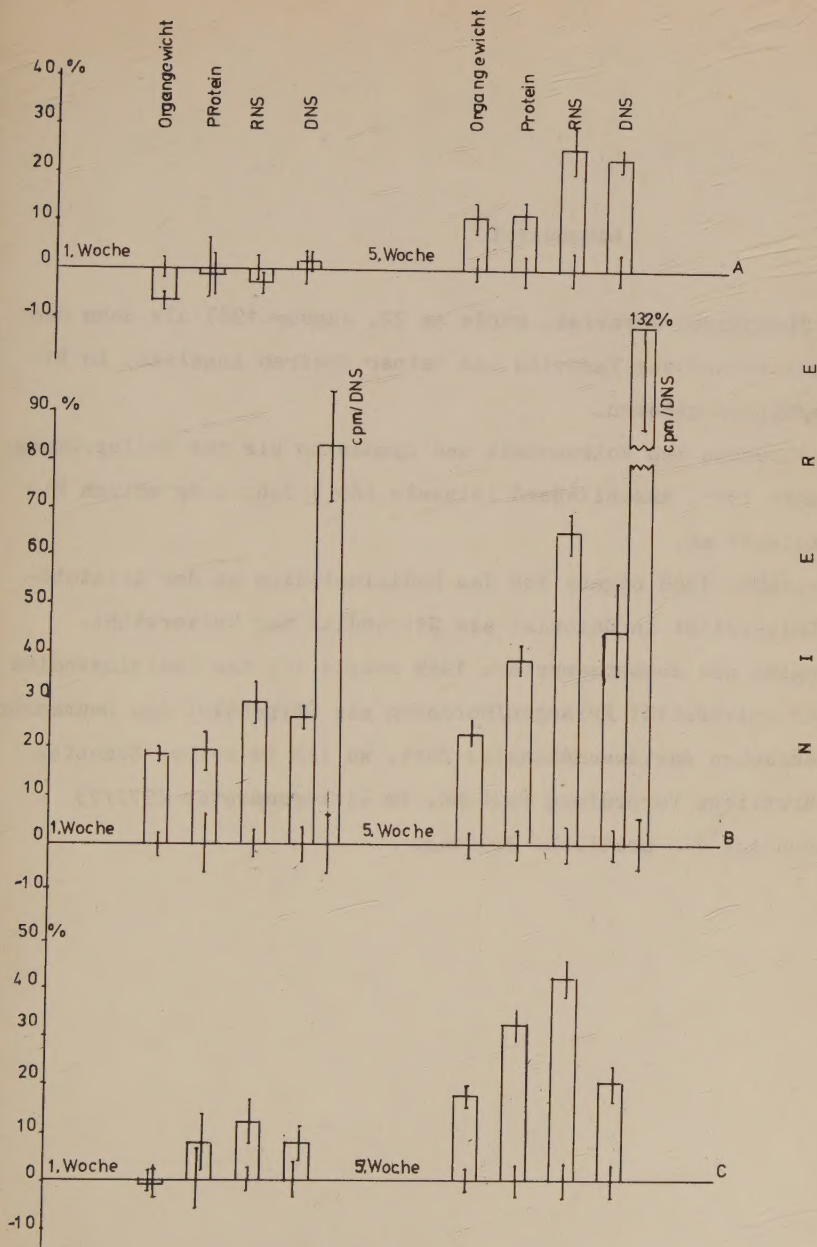
Prozentuale Änderungen gegenüber unbehandelten Kontrollen des Organgewichts und Gehalts der Niere an Protein, RNS und DNS 1 und 5 Wochen nach täglicher parenteraler Verabreichung von 0,05 mg/kg Äthinylöstradiol und 0,5 mg/kg Norgestrel.

(Mittelwert $\pm$ S.E.M. der Kontrolltiere

1. Woche:	Organgewicht:	135mg $\pm$ 2,7mg
	Protein:	16,6mg $\pm$ 1,0mg
	RNS:	713mg $\pm$ 20mg
	DNS:	596mg $\pm$ 22mg
	^3H -Thymidineinbau:	13,4cpm/DNS $\pm$ 0,8cpm/DNS
5. Woche:	Organgewicht:	147mg $\pm$ 3,9mg
	Protein:	22,5mg $\pm$ 0,75mg
	RNS:	752mg $\pm$ 27,9mg
	DNS:	606mg $\pm$ 19mg
	^3H -Thymidineinbau:	8,8cpm/DNS $\pm$ 0,5cpm/DNS







Lebenslauf

Ich, Theophanes Karavias, wurde am 22. Januar 1947 als Sohn des Apothekers Andreas Karavias und seiner Ehefrau Angelika, in Nicosia/Zypern geboren.

Dort besuchte ich Volksschule und Gymnasium bis zur Reifeprüfung im Jahre 1965. Anschließend leistete ich 1 Jahr lang meinen Militärdienst ab.

Im Dezember 1966 begann ich das Medizinstudium an der Aristoteles Universität in Saloniki als Stipendiat der Universität.

Zu Beginn des Sommersemesters 1969 setzte ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen/Nürnberg als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes fort, wo ich im selben Semester die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Wintersemester 1972/73 bestand ich die ärztliche Prüfung.

